

再生不良性貧血における自己抗原の解析：自己抗体によって同定された造血幹細胞抗原におけるCD4陽性T細胞エピトープの同定

著者	中尾 眞二
著者別表示	Nakao Shinji
雑誌名	平成16(2004)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	2003-2004
ページ	9p.
発行年	2005-05
URL	http://doi.org/10.24517/00051108



KAKEN
2004
24
金 沢 大 学

再生不良性貧血における自己抗原の解析：自己抗体によって同定された造血幹細胞抗原
におけるCD4陽性T細胞エピトープの同定

(研究課題番号 15390298)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書

平成17年5月

研究代表者 中 尾 眞 二

(金沢大学大学院医学系研究科教授)

金沢大学附属図書館



0500-04120-2

はじめに

再生不良性貧血は、造血幹細胞の持続的な減少のために、すべての血球の減少と骨髄の低形成を来す難治性の血液疾患である。造血幹細胞に対する自己免疫的な攻撃によって発症すると想像されているが、長年の研究にもかかわらず免疫反応の引き金となる自己抗原は不明であった。われわれは、HLA-DRB1*1501 の保有と発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 形質の血球の微増、という免疫病態の二つのマーカーを兼ね備えた再生不良性貧血患者の血清中に、巨核球への分化能を持つ白血病細胞株 UT-7 由来の 80kD 蛋白に対する抗体が存在することを見出した。同時に、この白血病細胞株の cDNA ライブラリーと患者血清を用いた SEREX 法により、同じ患者群の血清中に diazepam-binding inhibitor-related sequence-1 (DRS-1) に対する抗体が検出されることを明らかにした。

本申請課題の研究では、まず、一部の再生不良性貧血患者血清抗体によって認識される白血病細胞株 UT-7 由来の 80kD 蛋白を同定するため、免疫沈降により精製したこの蛋白のアミノ酸配列を mass fingerprinting を用いて同定した。その結果、この蛋白は、これまで一部の自己免疫疾患で自己抗体が証明されている細胞膜関連蛋白のモエシンであることが判明した。モエシンは、RhoA キナーゼによってリン酸化を受けることから、このキナーゼ活性が亢進している PNH 血球陽性再生不良性貧血の免疫学的な骨髄抑制メカニズムに関わっている可能性がある。この蛋白に対する血清中の抗体価を ELISA 法により測定したところ、再生不良性貧血患者 43 例中 20 例 (46.5%) にこの蛋白に対する抗体が検出された。抗体の陽性率は、PNH 型血球陽性の再生不良性貧血患者では 22 例中 14 例 (64%) であったのに対し、PNH 型血球陰性の再生不良性貧血患者 18 例 3 例 (17%) のみであった。本研究成果については、再生不良性貧血患者血清中存在する自己抗体の検出方法として特許を出願中 (出願番号特願 2004-333725) である。

さらに、モエシン抗体の性状を明らかにするためエピトープマッピングを行ったところ aa 347-360 (IKKAQQELEEQTRS) が抗体エピトープのホットスポットとして同定された。抗 80kD 抗体は、再生不良性貧血患者だけでなく、慢性関節リウマチ患者の約 4 割の患者血清中にも検出されることが知られている。慢性関節リウマチ患者血清中の抗モエシン抗体が同じエピトープを認識するかどうかについては今後明らかにする必要がある。

一方、UT-7 由来の cDNA ライブラリーのスクリーニングにより同定した蛋白 diazepam-binding protein-related sequence-1 (DRS-1) に対する抗体は PNH 血球増加再生不良性貧血例 84 例中の 32 例 (38.1%) に検出された。DRS-1

の cDNA 断片に由来する GST 融合蛋白を作成し、各々に対する抗体の有無を決定したところ、抗体陽性者の約半数において、173-198 位のペプチドに対する抗体が検出された。DRS-1 のアミノ酸配列は 2 種類の HLA-DR15 結合配列を含んでおり、その一方は、抗体エピトープと重複していた。この DR15 蛋白と結合する T 細胞エピトープのペプチドを合成し、DRS-1 ペプチド特異的 T 細胞の前駆細胞頻度を ELISPOT アッセイで調べたところ、抗 DRS-1 抗体陽性で DR15 を持つ患者では、検討した 2 例の両例において DRS-1 特異的 T 細胞の前駆細胞が高頻度に検出された。

さらに、再生不良性貧血患者の血清中に検出された抗 DRS-1 抗体は、慢性骨髄性白血病 (CML) 患者の血清中にも 33 例中 14 例 (42%) に検出された。CML 細胞株における DRS-1 発現の有無を、DRS-1 に対するモノクローナル抗体を用いた Western blotting により検索したところ、K562、KH88、KU812 など検索した 8 細胞株のうち 7 細胞株が DRS-1 を高発現していた。HLA-DR15 によって提示される DRS-1 ペプチドと、抗 DRS-1 抗体陽性者の末梢血単核細胞を用いて DRS-1 特異的 CD4 陽性 T 細胞を誘導し、DR15 陽性の KH88 に対する細胞傷害性を検討したところ、T 細胞の用量依存性に KH88 が傷害された。これらの所見から、抗 DRS-1 抗体を持つ HLA-DR15 陽性 CML 患者においては、DRS-1 特異的 CD4 陽性が CML 幹細胞の抑制に関わっている可能性が示唆された。

研究組織

研究代表者: 中尾 眞二 (金沢大学大学院医学系研究科教授)

研究分担者: 中条 達也 (金沢大学医学部附属病院助手) 平成 15 年度のみ

高見 昭良 (金沢大学医学部附属病院助手)

石山 謙 (金沢大学医学部附属病院助手) 平成 16 年度のみ

大川 克也 キリンビール (株) 医薬探索研究所

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	7,100	0	7,100
平成 16 年度	3,600		3,600
総計	10,700	0	10,700

研究発表

(1) 学会誌など

1. Zhu J, Okumura H, Ohtake S, Nakamura S, Nakao S: Arsenic trioxide induces apoptosis in leukemia/lymphoma cell lines via the CD95/CD95L system. *Oncol Rep* 10:705-709, 2003.
2. Zhu J, Okumura H, Ohtake S, Nakamura S, Nakao S: The molecular mechanism of arsenic trioxide-induced apoptosis and oncosis in leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Haematol* 110:1-10, 2003.
3. Chuhjo T, Yachie A, Kanegane H, Kimura H, Shiobara S, Nakao S: Epstein-Barr virus (EBV)-associated post-transplantation lymphoproliferative disorder simultaneously affecting both B and T cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Hematol* 72:255-258, 2003
4. Ishiyama K, Chuhjo T, Wang H, Yachie A, Omine M, Nakao S: Polyclonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. *Blood* 102:1211-1216, 2003
5. Koizumi K, Nakao S, Haseyama Y, Kato H, Ohi M, Motohara T, Endo T, Sawada K, Koike T: Severe aplastic anemia associated with thymic carcinoma and partial recovery of hematopoiesis after thymectomy. *Ann Hematol* 82:367-370, 2003
6. Sugimori C, Kaito K, Nakao S: Persistent remission after immunosuppressive therapy of hairy cell leukemia mimicking aplastic anemia: two case reports. *Int J Hematol* 77:391-394, 2003
7. Takami A, Asakura H, Koshida K, Namiki M, Nakao S: Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for renal cell carcinoma: in vivo evidence of a graft-versus-tumor effect. *Haematologica* 89:375-376, 2004.
8. Endo T, Nakao S, Koizumi K, Nishio M, Fujimoto K, Sakai T, Kumano K, Obara M, Koike T: Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein-Barr virus and monoclonal gammopathy in a post-nonmyeloablative stem cell transplant patient. *Ann Hematol* 83:114-116, 2004.
9. Feng X, Chuhjo T, Sugimori C, Kotani T, Lu X, Takami A, Takamatsu H, Yamazaki H, Nakao S: Diazepam-binding inhibitor-related protein 1:

- a candidate autoantigen in acquired aplastic anemia patients harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. Blood 104: 2425-2431, 2004
10. Takami A, Sugimori C, Feng X, Yachie A, Kondo Y, Nishimura R, Kuzushima K, Kotani T, Asakura H, Shiobara S, Nakao S: Expansion and activation of minor histocompatibility antigen HY-specific T cells associated with graft-versus-leukemia response. Bone Marrow Transplant 34: 703-709, 2004
 11. Ishiyama K, Takami A, Shiobara S, Koizumi S, Nakao S: Graft-versus-leukemia effect of allogeneic stem cell transplantation; a Japanese single center study. Haematologica 89: 887-889, 2004

(2) 口頭発表

1. 中尾眞二：Graft-vs-leukemia 効果と graft-vs-tumor 効果・第 26 回日本医学会総会学術講演会・2003 年 4 月・福岡
2. 中尾眞二：骨髄不全の病態と治療・平成 15 年度北海道血液学同好会総会第 38 回日本血液学会北海道地方会・2003 年 4 月・北海道
3. 中尾眞二：骨・軟骨腫瘍 他科領域の最先端に学ぶ・第 76 回日本整形外科学会学術集会・2003 年 5 月・金沢
4. 石山 謙、中尾眞二：骨髄不全患者における染色体異常の臨床的意義：クロナリティ解析による「病的クローン」と「非病的クローン」の鑑別・第 1 回幹細胞シンポジウム・5 月・大阪
5. 山崎宏人、中条達也、石山 謙、中尾眞二：再生不良性貧血に対するダナゾール療法有効例の特徴・第 65 回日本血液学会総会、第 45 回日本臨床血液学会・2003 年 8 月・大阪
6. 馮 興民、中条達也、石山 謙、杉盛千春、山崎宏人、高見昭良、中尾眞二：再生不良性貧血における新規自己抗原の検出・第 65 回日本血液学会総会、第 45 回日本臨床血液学会総会・2003 年 8 月
7. 中尾眞二：造血器悪性腫瘍－最近の治療の進歩、がん学術セミナー・2003 年 11 月・富山
8. 杉盛千春、山崎宏人、高見昭良、中条達也、笠原善仁、小泉晶一、中尾眞二：HLA-DR 不適合造血幹細胞移植後の GVHD 発症時における CD4 陽性 T 細胞の抗原特異的増殖・第 26 回日本造血細胞移植学会総会・2003 年 12 月・横浜
9. Takami A, Sugimori C, Feng X, Wang W, Akatsuka Y, Kuzushima K, Shiobara S, Nakao S : Identification of HLA-A*2402-restricted

- polymorphic peptides derived from CD62L that may mediate graft-versus-leukemia effect・第45回アメリカ血液学会・2003年12月・アメリカ・サンディエゴ
10. Feng X, Chuhjo T, Kotani T, Takamatsu H, Sugimori C, Takami A, Yamazaki H, Nakao S: Diazepam-binding inhibitor related sequence-1(DRS-1):A Candidate autoantigen in acquired aplastic anemia: 第45回アメリカ血液学会・2003年12月・アメリカ・サンディエゴ
 11. Kondo Y, Lu S, Wieder E, Molldrem JJ: Cyclin E2 Peptide-Specific CTL Clone Shows Cross Recognition of a Homologous Cyclin E1 Peptide and Kills Lymphoid and Myeloid Leukemia Cells・第45回アメリカ血液学会・2003年12月・アメリカ・サンディエゴ
 12. Chuhjo T, Wang H, Ishiyama K, Nakao S: Genomic Instability Is Less Accelerated in Bone Marrow Failure Patients with a Minor Population of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH)-Type Blood Cells Than in Those without Such PNH-Type Cells・第45回アメリカ血液学会・2003年12月・アメリカ・サンディエゴ
 13. Sugimori C, Chuhjo T, Wang H, Feng X, Nakao S: Roles of HLA-DR15 Alleles in the Immune Mechanisms of Acquired Aplastic Anemia: Methods of Contribution Differ Between DRB1*1501 and DRB1*1502・第45回アメリカ血液学会・2003年12月・アメリカ・サンディエゴ
 14. 高見昭良、戸来依子、高松博幸、山内博正、大畑欣也、塩原信太郎、中尾眞二:中枢神経系悪性リンパ腫に対する骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植:2例の経験・第26回日本造血細胞移植学会・2003年12月・横浜
 15. 山崎宏人、中条達也、犬塚賀奈子、徳田麗、杉盛千春、高見昭良、中尾眞二:ハイリスク AML に対する同種造血幹細胞移植後の再発予防:WT1 を指標とした早期 intervention の試み・第26回日本造血細胞移植学会・2003年12月・横浜
 16. 高見昭良、荒幡昌久、林 朋恵、吉田知孝、朝倉英策、中尾眞二:腎機能障害を伴わないシクロスボリンによる高カリウム血症:発症機序における考察・第5回日本検査血液学会・2004年7月・金沢
 17. 馮 興民、中条達也、廬 緒章、杉盛千春、中尾眞二:再生不良性貧血の発症における DRS-1 特異的 T 細胞の役割:その機能と患者末梢血中の頻度・第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会・2004年9月・京都
 18. Takami A, Yamazaki H, Ishiyama K, Sugimori C, Mochizuki K, Takamatsu H, Kumano Y, Asakura H, Okumura H, Shiobara S, Nakao

S: Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies: a single center experience · The 10th Congress of the International Society of Hematology Asian-Pacific Division · 2004 年 9 月 · 名古屋

19. 高見昭良、朝倉英策、山崎宏人、石山 謙、杉盛千春、望月果奈子、高松博幸、熊野義久、奥村廣和、塩原信太郎、中尾眞二：当院におけるミニ移植・第 66 回日本血液学会 & 第 46 回日本臨床血液学会 · 2004 年 9 月 · 京都
20. Yamazaki H, Chujo T, Sugimori C, Ishiyama, K Nakao S: Identification of a Subset of Aplastic Anemia Patients Highly Responsive to Danazol · 第 46 回アメリカ血液学会総会 · 2004 年 12 月 · アメリカ · サンディエゴ
21. Sugimori C, Chujo T, Lu X, Feng X, Ishiyama K, Yamazaki H, Takami A, Nakao S: A Minor Population of CD55⁺CD59⁻ Blood Cells Detected by Flow Cytometry in Aplastic Anemia Patients: A Reliable Marker for Good Response to Immunosuppressive Therapy · 第 46 回アメリカ血液学会総会 · 2004 年 12 月 · アメリカ · サンディエゴ
22. Feng X, Chujo T, Lu X, Takamatsu H, Sugimori C, Takami A, Nakao S: Identification of Hematopoietic Progenitor Cells by CD4⁺ T Cells Specific for an Endogenous Peroxisomal Protein, DRS-1: A Possible Mechanism for Bone Marrow Failure in Individuals Carrying HLA-DR15 · 第 46 回アメリカ血液学会総会 · 2004 年 12 月 · アメリカ · サンディエゴ
23. 高見昭良、山崎宏人、石山 謙、杉盛千春、望月果奈子、高松博幸、熊野義久、奥村廣和、塩原信太郎、中尾眞二：同種造血幹細胞移植後サイトメガロウィルス感染に関する検討 · 第 27 回日本造血細胞移植学会 · 2004 年 12 月 · 岡山
24. 高松博幸、高見昭良、石山 謙、林 朋恵、山崎宏人、塩原信太郎、中尾眞二：腎細胞癌に対する臍帯血を用いた骨髓非破壊的同種造血幹細胞移植 · 2004 年 12 月 · 第 27 回日本造血細胞移植学会 · 岡山
25. 中尾眞二：造血幹細胞移植の最近の動向 · 日本内科学会東海支部第 34 回生涯教育講演会 · 2005 年 2 月 · 三重

(3) 出版物

1. 中尾眞二. 再生不良性貧血. 「内科 91 巻 6 号」 (本郷充彦 編) 南光堂. 東京: P1382, 2003
2. 中尾眞二. CD59. 「内科 91 巻 6 号」 (本郷充彦 編) 南光堂. 東京: P1383, 2003
3. 中尾眞二. 造血幹細胞移植. 「分子予防環境医学 生命科学の予防・環境医学

- への統合」(分子予防環境医学研究会 編)本の泉社.東京:P727-734,2003
4. 中尾眞二. 再生不良性貧血における幹細胞移植. 「Annual Review 血液 2004」(高久史麿、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉 讓 編)中外医学社.東京:P37-44,2004
 5. 中尾眞二. 骨髓異形性症候群の病理・病態生理免疫異常. 「新しい診断と治療の ABC 19」最新医学社.大阪:P83-91,2004
 6. 中尾眞二. 再生不良性貧血(成人). 「必携 造血細胞移植—わが国のエビデンスを中心に」(小寺良尚、加藤俊一 編)医学書院.東京,P361-369,2004
 7. 中尾眞二. 赤血球系疾患 4 再生不良性貧血. 「EBM 内科処方指針」(黒川清、寺本民生 編)中外医学社.東京:P659-663,2004
 8. 中尾眞二. 再生不良性貧血. 「プライマリーケアの実際 臨床研修マニュアル」臨床医 2004 vol.30 増刊号(青木三千雄 編)中外医学社.東京:P1126-1128,2004
 9. 中尾眞二. 悪性貧血. 「今日の治療指針 ポケット判」(山口 徹、北原光夫 編)医学書院.東京:P457-458,2005
 10. 中尾眞二. 経口鉄キレート剤による鉄過剰症の治療. 「Annual Review 血液 2005」中外医学社.東京,P107-112,2005
 11. 中尾眞二. 造血幹細胞移植の最近の動き 3.GVL 効果とドナーリンパ球輸注. 「細胞医療」(高上洋一 編)医薬ジャーナル社.大阪:P138-147,2005

研究成果

平成 13～14 年度に行った研究に関係の深い発表済みの 3 つの論文と、投稿中の 1 論文の掲載をもって研究成果の報告とする。

1. Ishiyama K, Chuhjo T, Wang H, Yachie A, Omine M, Nakao S: Polyclonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. Blood 102:1211-1216, 2003
2. Sugimori C, Kaito K, Nakao S: Persistent remission after immunosuppressive therapy of hairy cell leukemia mimicking aplastic anemia: two case reports. Int J Hematol 77:391-394, 2003
3. Feng X, Chuhjo T, Sugimori C, Kotani T, Lu X, Takami A, Takamatsu H, Yamazaki H, Nakao S: Diazepam-binding inhibitor-related protein 1: a candidate autoantigen in acquired aplastic anemia patients harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. Blood 104: 2425-2431, 2004
4. Sugimori C, Chuhjo T, Wang H, Feng X, Takami A, Teramura M,

Mizoguchi H, Omine M, Nakao S: Roles of HLA-DR15 alleles in the pathophysiology of acquired aplastic anemia: methods of contribution differ between DRB1*1501 and DRB1*1502.
Submitted for publication